

A 3

茶葉中のパーオキシダーゼに関する研究

加藤好武・竹尾志一 (農林省茶葉試験場製茶部)

〔目的〕

茶葉摘採後の生葉の変質に関与すると考えられる、茶葉中のパーオキシダーゼの性質と作用機構を調べ、摘採後の生葉変質の機構を明らかにする事を目的とする。

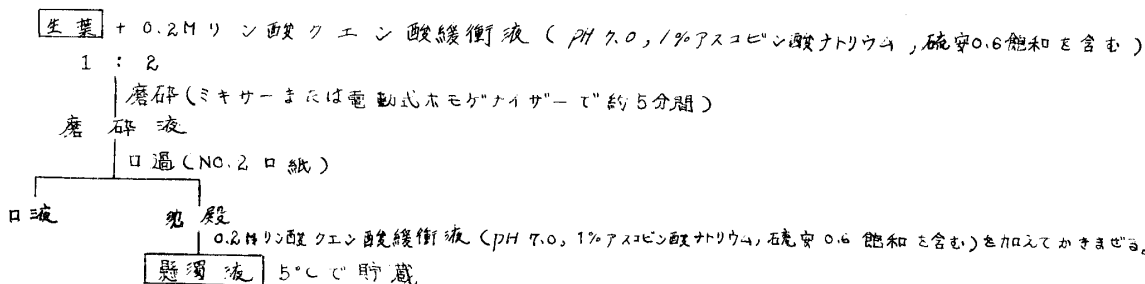
〔方法〕

今回は本研究の初年度にあたるので、まず茶葉中よりパーオキシダーゼを抽出し、セルロースイオン交換クロマトグラフィーによりいくつかのフュンクシオンに分画した。更にこれを電気泳動にかけた。

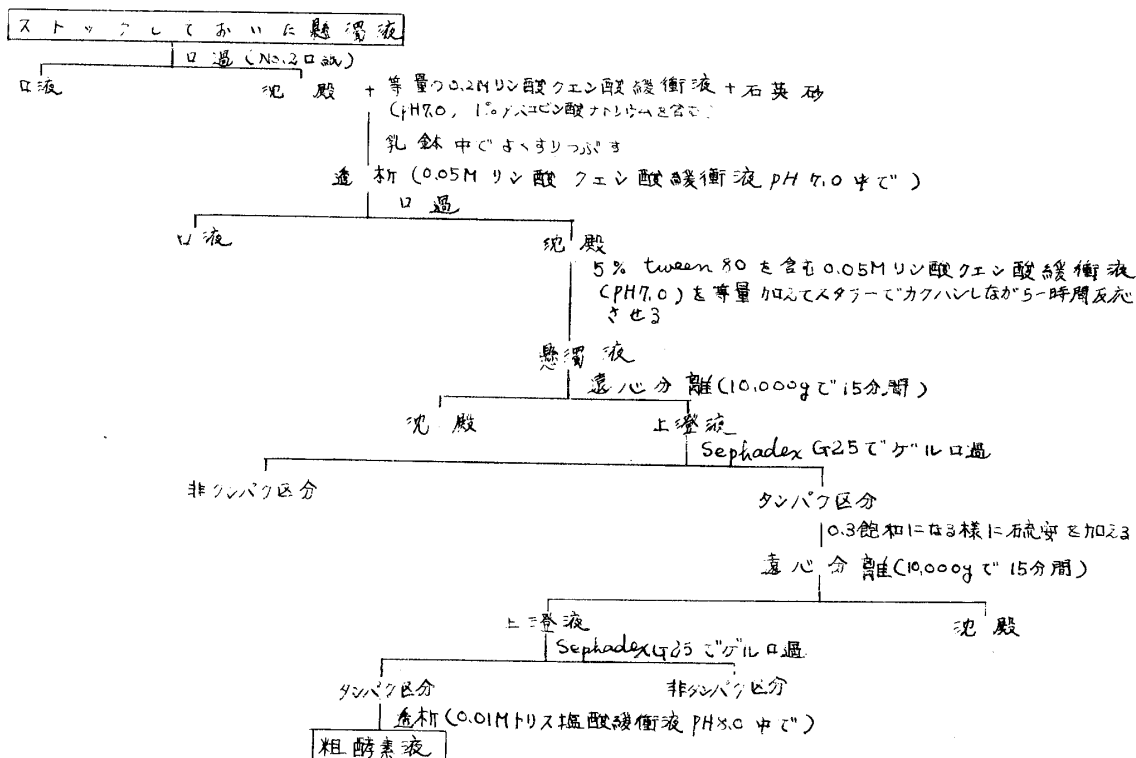
1) 実験用サンプルおよびその調整法

a) 茶葉サンプル: 当該試験場圃場より9月27日に摘採したべにふじを用いた。

b) サンプルの調整法



2) 粗酵素の抽出法

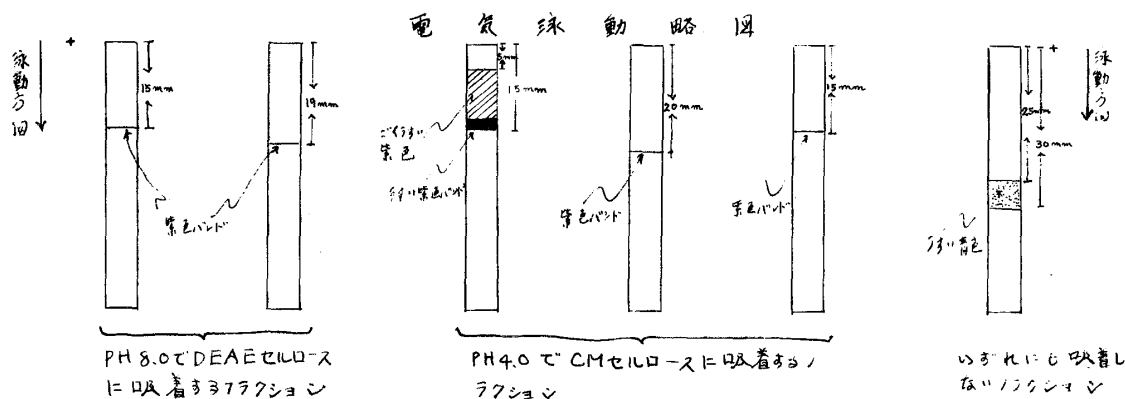


3)粗酵素の分画方法：まず0.01Mトリス塩酸緩衝液(pH8.0)を用いてDEAEセルロースカラムクロマトグラフィーを行い、pH8.0でDEAEセルロースに吸着するフラクションと吸着しないフラクションに大きくわけた。吸着したフラクションについては塩化ナトリウムを用いた濃度勾配法によりクロマトグラフィーを行った。そしてパーオキシダーゼ活性曲線と280mμの吸収曲線のピークが一致するまでクロマトグラフィーをくり返した。次にpH8でDEAEセルロースに吸着しないフラクションは0.02Mリン酸クエン酸緩衝液(pH4.0)を用いてCMセルロースカラムクロマトグラフィーを行い、CMセルロースに吸着するフラクションと吸着しないフラクションにわけた。CMセルロースにpH4.0で吸着するフラクションは更に塩化ナトリウムを用いた濃度勾配法によりクロマトグラフィーを行い、いくつかのフラクションにわけた。そしてそれぞれのフラクションについてパーオキシダーゼ活性曲線と280mμ吸収曲線のピークが一致するまでクロマトグラフィーをくり返した。なおpH8でDEAEセルロースにもpH4でCMセルロースにも吸着しないフラクションはCarbowax6000で濃縮した。

4)電気泳動について：以上の様な方法で分画した各フラクションをアクリルアミドを使ったディスク電気泳動にかけた。

〔結果〕

茶葉中のパーオキシダーゼはイオン交換セルロースカラムクロマトグラフィーによりpH8.0でDEAEセルロースに吸着するフラクションを2つ、pH4.0でCMセルロースに吸着するフラクションを3つ、いずれにも吸着しないフラクションを1つ分画する事が出来た。しかもこれらは電気泳動によってもはっきりとわかれるので、茶葉中のパーオキシダーゼにはかくとも6つのアイソザイムが認められた。なおこの6つのアイソザイムをそれぞれ電気泳動した時の一例を示すと次の様である。



泳動条件： A液 KOH } pH 4.2
 木酢酸 }
 TEMED }
 電流 2mA / 1本
 F液 グリシン } pH 4.0
 木酢酸 }
 泳動時間 3時間

発色剤： quaiacol , ベンジジン , H₂O₂ , MnSO₄ , 酢酸 , 酢酸ナトリウム